

氏名	坂上 信忠		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	農学		
学位授与番号	博乙第4465号		
学位授与の日付	平成28年 9月30日		
学位授与の要件	博士の論文提出者 (学位規則第4条第2項該当)		
学位論文の題目	電気化学的呼吸量測定による豚胚の客観的評価と胚移植による種豚生産システムの開発に関する研究		
論文審査委員	教授 舟橋 弘晃	准教授 若井 拓哉	教授 木村 康二

学位論文内容の要旨

現在、肉豚の生産農場では、優れた能力の種豚を外部から生体で導入し、種雄豚と種雌豚を交配し生まれた子豚を肥育することで豚肉生産を行っている。しかし、生体での種豚の導入は疾病伝搬や馴致失敗などのリスクを伴うことから、胚移植による種豚導入が可能になれば、そのリスクを軽減することが可能と考えられる。一方で、豚は子宮角が長く胚採取は外科的な手法が必要であるため、外科手術が可能な限定された施設でしか胚採取を行うことができず、生産現場で胚移植を行うためには、採取した胚を農場に輸送して受胚豚に移植するか、一度超低温保存した後に加温して移植する必要がある。

そこでこれらの課題を解決するために、胚の品質を客観的に評価する方法の検討を行い、さらに、疾病伝搬リスクの低い Micro Volume Air Cooling (MVAC)法によるガラス化保存法を用いて超低温保存胚の移植手法を確立する一方で、生産現場へ胚を輸送するための輸送方法を検討し、これらをもとに種豚を効率的に生産するシステムを検討した。

はじめに、豚体内発育胚の呼吸量測定による客観的評価について検討した。人工授精後 6 日目の胚 (D6BL) の呼吸量 ($\times 10^{-14} \text{ mol s}^{-1}$) を測定後、培養し透明帯からの脱出を確認したところ、脱出胚の培養前の呼吸量 1.05 ± 0.09 (平均値 \pm 標準誤差) は、非脱出胚の 0.77 ± 0.05 と比較して有意に高かった。

次に、血清等の動物由来成分を含まないガラス化保存液と、液体窒素に直接接しない手法で超低温保存する MVAC 法を用いて保存した胚の、電気化学的呼吸量測定による評価について検討を行った。D6BL を MVAC 法でガラス化保存した。加温後の胚の呼吸量を測定し、培養後の発育性を調査したところ、生存率は 85%、透明帯脱出率は 45%であった。48 時間培養後に脱出した胚の加温直後の呼吸量は 0.88 ± 0.06 で、非脱出胚の 0.53 ± 0.04 より有意に高かった。

さらに、化学的合成培地と試作した輸送器で輸送した場合の発育性を調査した。ストロー内に胚を密封した密封区と、炭酸ガス濃度 5%、温度 38°C を維持可能な試作輸送器で輸送したガス濃度調整区を、輸送せず低酸素培養器で培養した非輸送区と比較した。密封区とガス濃度調整区の胚は宅配便で約 22 時間輸送した。その結果、ガス濃度調整区では、非輸送区と同等の生存率(輸送区 100%、非輸送区 97.4%)、透明帯脱出率(輸送区 57.9%、非輸送区 47.5%)が確認された。

最後に、呼吸量を利用した種豚生産システムを検討した。D5 胚を、経産豚 11 頭に非外科的に移植したところ、平均呼吸量が 0.59 より低い胚を移植した 4 頭の受胚豚では受胎が確認されなかったが、呼吸量が 0.59 より高い胚を移植した 7 頭のうち 3 頭が受胎し 20 頭の子豚が得られた。次に MVAC 法でガラス化保存した胚の加温後の呼吸量を測定したところ、平均呼吸量は 0.96 ± 0.04 でこれを 2 頭に外科的に移植したところ、2 頭とも受胎した。最後に、新鮮胚を輸送後に非外科的に移植したところ、受胎例は得られなかったが、ガラス化加温胚を輸送し 3 頭の受胚豚に移植したところ、平均呼吸量が高い胚を移植した受胚豚 1 頭で受胎が確認された。

以上の結果から、電気化学的呼吸量測定による胚の品質評価法と、ガラス化保存技術や輸送技術を組み合わせたシステムで受胎例が得られ、有効に活用できる種豚生産システムを確立した。

論文審査結果の要旨

本提出論文は、家畜の増殖手法およびヒト生殖補助医療技術として広く利用されている凍結受精卵移植技術による産子作出効率の向上を図るために、これまで凍結保存や輸送に対する極めて低い耐性が繰り返し報告されているブタ受精卵の呼吸量測定による非破壊的品質評価法の有効性を明らかにするとともに、それを利用した凍結ブタ受精卵の超低温保存後の移植効率を格段に改善するための技術開発についての成果をまとめたものである。

まず、豚体内発生受精卵の呼吸量測定による客観的評価について検討し、その後の発生能が胚盤胞の呼吸量と相関があることを明らかにした。次に、疾病伝搬リスクの低いMicro Volume Air Cooling (MVAC)法によるガラス化保存法を用いて超低温保存受精卵のその後の発生能の評価についても、超低温保存後の受精卵の呼吸量がその後の発生能を十分推定できることを明らかにすることで、超低温保存胚の移植手法を確立した。また、生産現場へ受精卵を輸送するための輸送方法を検討するために、振動と試作輸送器を用いて炭酸ガス濃度調整の影響を調べ、輸送時に炭酸ガス濃度を調整することで非輸送受精卵と同様の生存率と初期発生能を確認した。最後にこれらの技術を組み合わせることで、超低温保存後に加温受精卵を輸送した受精卵を移植後に受胎例を得ることに成功した。

以上の知見は、実用的かつ効率的なブタの受精卵移植技術として、さらにそれに係わる基礎資料として、高く評価できる。また、本提出論文が明らかにした知見は、人類にとって重要な肉資源の一つであるブタの改良増殖効率の改善に役立ち、産業上も極めて意義深いものである。これらの成果は、養豚現場での暑熱期受胎率向上ツールとして活用が期待されるだけでなく、この非破壊的品質評価法は、ヒトを含む様々な哺乳動物受精卵の品質評価での活用が可能である。

以上のことから、本学位審査委員会は、これらの成果をまとめた本論文の内容および参考文献を総合的に審査し、本論文は、博士（農学）の学位に値すると判断した。